

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 09 JUN 2004

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 37 344.6

Anmeldetag: 12. August 2003

Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH,
68165 Mannheim/DE

Bezeichnung: Vorrichtung zum Nachweis von Photonen eines
Lichtstrahls

IPC: G 01 J, G 01 N

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. April 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
im Auftrag

Agurks

BEST AVAILABLE COPY

4211/P/117

Heidelberg, 12. August 2003/kb

Patentanmeldung

der Firma

Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Am Friedensplatz 3

68165 Mannheim

betreffend eine

„Vorrichtung zum Nachweis von Photonen eines Lichtstrahls“

*Repräsentanz Spanien
E – 03720 Benissa, Alicante
C/ Andalucia, M(2) – 56*

*Luisenstraße 14
D-69115 Heidelberg
Telefon +49 62 21/60 43-0
Telefax +49 62 21/60 43-60
e-mail: un@hd-patent.de*

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum Nachweis von Photonen eines Lichtstrahls, der von einer räumlich begrenzten Quelle ausgeht, insbesondere zum Einsatz in einem Fluoreszenzmikroskop, umfassend eine Detektionseinrichtung.

Speziell in der Fluoreszenzmikroskopie ist aufgrund der im Allgemeinen relativ geringen Intensität der Fluoreszenzsignale das Signal/Rausch-Verhältnis ein kritischer Parameter. Dieses Verhältnis wird bestimmt durch die Anzahl der auf den Detektor treffenden Photonen sowie durch die Detektionseffizienz und das Rauschen des Detektors. Die Detektionseffizienz ist durch die Quanteneffizienz des Detektors gegeben, d.h. durch die Wahrscheinlichkeit, dass ein auf den Detektor treffendes Photon tatsächlich ein Detektionssignal erzeugt. Wird der Detektor im „Photon-Counting“ Modus betrieben, d.h. jedes Photon erzeugt ein eigenes Detektionssignal, so ergibt sich das Signal/Rausch-Verhältnis im Wesentlichen aus der Poisson-Statistik als \sqrt{n} , wobei n die Anzahl der nachgewiesenen Photonen bezeichnet.

Beim Betrieb eines Detektors im Photon-Counting Modus ist grundsätzlich die Totzeit des Detektors problematisch. Totzeit bezeichnet diejenige Zeit, die vergeht, bis der Detektor nach Detektion eines Photons wieder zum Nachweis eines nächsten Photons zur Verfügung steht, also quasi die Zeit, die der Detektor zur Verarbeitung eines Ereignisses benötigt.

Ein in letzter Zeit in zunehmendem Maße eingesetzter Detektor zum Photonen-nachweis ist die Avalanche-Photodiode (APD), auch als Lawinendiode bezeichnet. Die höchste Nachweiswahrscheinlichkeit besitzen APDs für Licht mit Wellenlängen zwischen ca. 200 nm und 1050 nm, so dass sie sich insbesondere auch für den Einsatz im Bereich von Fluoreszenzlichtmessungen eignen. Zudem besitzen APDs eine hohe Quanteneffizienz.

Für APDs beträgt die Totzeit ca. 50 ns, während sie im Falle von Photomultipliern etwas geringer ist. Damit im Photon-Counting Modus keine Photonen verloren gehen – und zudem die APDs nicht durch einen zu hohen auftreffenden Strahlungsfluss beschädigt werden – muss eine hinreichend geringe Bestrahlung des Detektors sichergestellt sein. Für den Betrieb eines Fluoreszenzmikroskops bedeutet dies beispielsweise, dass die zu untersuchende Probe nur mit einer sehr geringen Beleuchtungslichtstärke angeregt werden kann, was im Ergebnis dazu führt, dass für

Bildaufnahmen hoher Qualität, d.h. mit einer hinreichenden Photonenstatistik, eine relativ lange Zeit benötigt wird. Schnelle biochemische Prozesse in der Probe, die auf einer Zeitskala ablaufen, die kürzer ist als die Zeitskala der Bildaufnahme, sind herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen folglich nicht zugänglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, eine gattungsbildende Vorrichtung zum Nachweis von Photonen eines Lichtstrahls mit einfachen Mitteln derart auszugestalten und weiterzubilden, dass durch die Detektionseinrichtung ein höherer Photonenfluss nachweisbar ist, d.h. die maximale Zählrate, die von der Detektionseinrichtung verarbeitet werden kann, erhöht ist.

Die voranstehende Aufgabe ist durch die Merkmale des Patentanspruchs 1 gelöst. Danach ist die gattungsbildende Vorrichtung zum Nachweis von Photonen eines Lichtstrahls dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinrichtung mindestens zwei Detektoren umfasst und dass im Strahlengang des Lichtstrahls ein Bauteil vorgesehen ist, mit dem der Lichtstrahl derart aufspaltbar ist, dass sich die Photonen zum Zwecke des Nachweises auf die Detektoren verteilen.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, dass beim Betrieb eines Detektors im Photon-Counting Modus die Totzeit des Detektors das begrenzende Kriterium im Hinblick auf die maximale Beleuchtungsintensität darstellt. Darüber hinaus ist erkannt worden, dass der im Photon-Counting Modus nachweisbare maximale Photonenfluss im Lichtstrahl durch eine Parallelisierung erhöht werden kann, indem nämlich die nachzuweisenden Photonen auf mehrere Detektoren verteilt werden. Erfindungsgemäß ist dazu im Strahlengang des Lichtstrahls ein Bauteil zur Aufspaltung des Lichtstrahls vorgesehen.

Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung kann beispielsweise in einem Fluoreszenzmikroskop die Beleuchtungsintensität und damit verbunden die Aufnahmege-
schwindigkeit erhöht werden, so dass die Bilder schneller erstellt werden können und somit auch schnell ablaufende biologische oder biochemische Reaktionen in einer Probe sichtbar gemacht werden können. Ebenso ist es möglich, in der gleichen Aufnahmezeit eine höhere Bildqualität aufgrund erhöhter Photonenstatistik zu erzielen. Beim Einsatz von n Detektoren erhöht sich die maximal mögliche Zählrate

um den Faktor n , und das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert sich entsprechend um den Faktor \sqrt{n} .

Abgesehen vom Photon-Counting Modus wird durch die erfindungsgemäße Vorrichtung generell der Dynamikbereich der Detektionseinrichtung erhöht. Die Sättigungsschwelle, bei der der auf die Detektionseinrichtung auftreffende Photonenfluss so hoch ist, dass eine weitere Erhöhung des Flusses keine weitere Verstärkung des Ausgangssignals der Detektionseinrichtung bewirkt, wird ebenfalls um den Faktor n der Anzahl der Einzeldetektoren erhöht.

In vorteilhafter Weise könnten Detektoren eingesetzt werden, die zum Einzelphotonennachweis geeignet sind, d.h. mit anderen Worten im Photon-Counting Modus betrieben werden können. Dazu wird der Detektor mittels einer hohen angelegten Spannung im Geigermodus betrieben. Wenn ein Photon auf den Detektor trifft, werden – im Falle einer APD – Elektron-Lochpaare erzeugt, und der Detektorausgang befindet sich in der Sättigung. Das auf diese Weise erzeugte Spannungssignal wird am Detektorausgang abgegriffen und als Ereignis in einen internen Speicher geschrieben, der nach Beendigung der Datenaufnahme ausgelesen wird.

Neben den Avalanche-Photodioden könnten zum Nachweis der Photonen ebenso andere Detektortypen, beispielsweise Photomultiplier oder EMCCDs (Electron Multiplying CCD), eingesetzt werden.

Im Hinblick auf eine kompakte Ausführung könnten die Detektoren ein Array bilden. In der einfachsten Ausführungsform könnte es sich dabei beispielsweise um ein eindimensionales Array im Sinne einer Zeilenanordnung handeln. Im Hinblick auf eine weitergehende Aufteilung der Photonen könnte es sich um ein flächiges Array handeln, bei dem die Detektoren zeilen- und spaltenförmig angeordnet sind.

Im Falle des Einsatzes von EMCCDs könnte sogar ein dreidimensionales Array realisiert werden, indem nämlich einzelne teillichtdurchlässige EMCCDs in mehreren Ebenen hintereinander angeordnet werden. Auftreffende Photonen durchdringen dann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die erste(n) Ebene(n) und werden erst in einer tieferen Ebene von den EMCCDs nachgewiesen.

Die Aufspaltung des Lichtstrahls könnte auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Denkbar ist beispielsweise eine Aufspaltung, bei der eine statistische Verteilung der Photonen erzeugt wird. Besonders einfach ließe sich eine derartige Photonenverteilung durch eine einfache Defokussierung des Lichtstrahls erreichen, beispielsweise durch Brechung des Lichtstrahls mittels einer zylinderförmigen Linse.

Es ist des Weiteren eine Aufspaltung des Lichtstrahls denkbar, bei der eine spektrale Verteilung der Photonen erzeugt wird. Im Konkreten könnte eine derartige Aufspaltung beispielsweise durch ein Prisma realisiert sein. Bei einer spektralen Aufspaltung ergibt sich in besonders vorteilhafter Weise die Möglichkeit, die Detektoren in dem Array individuell an einen bestimmten Spektralbereich anzupassen. In Abhängigkeit vom Spektralbereich könnten beispielsweise unterschiedlich sensitive Photokatoden verwendet werden.

Neben den bereits genannten Bauteilen zur Aufspaltung des Lichtstrahls sind grundsätzlich auch elektrooptische Elemente oder elektromechanische Scanner einsetzbar. Insbesondere könnten auch mehrere – unterschiedliche – Bauteile im Lichtstrahl hintereinander angeordnet sein. Auf diese Weise könnten ganz gezielte Verteilungsmuster der Photonen erzeugt werden, beispielsweise zunächst eine Defokussierung in einer Richtung und danach eine spektrale Aufspaltung in einer dazu senkrechten Richtung.

Die für das Photon-Counting notwendige Schwellwertbestimmung sowie ein elektronischer Zähler zum Zählen der nachgewiesenen Photonenereignisse könnten in vorteilhafter Weise nahe am Detektor angeordnet sein. Speziell beim Einsatz von EMCCDs könnte der Zähler sogar unmittelbar auf dem Chip angeordnet sein.

Eine entsprechende Zähllogik zum Zählen der nachgewiesenen Photonenereignisse könnte in vorteilhafter Weise auf einem FPGA (Field Programmable Gate Array) programmiert sein. Addierer könnten sowohl vor als auch nach dem Counter vorgesehen sein. Zudem könnte die gesamte Elektronik monolithisch aufgebaut sein.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die

dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung bevorzugter Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigt

- Fig. 1 in einer schematischen Ansicht ein erstes Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Aufspaltung des Lichtstrahls mit statistischer Photonenverteilung in einer Richtung und einem ein-dimensionalen Detektorarray,
- Fig. 2 in einer schematischen Ansicht ein zweites Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Aufspaltung des Lichtstrahls mit spektraler Photonenverteilung in einer Richtung und einem eindimensionalen Detektorarray,
- Fig. 3 in einer schematischen Ansicht ein drittes Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Aufspaltung des Lichtstrahls in zwei Richtungen und einem zweidimensionalen Detektorarray und
- Fig. 4 in einer schematischen Ansicht das Ausführungsbeispiel aus Fig. 1, wobei zusätzlich die zugehörige Verarbeitungselektronik dargestellt ist.

Fig. 1 zeigt einen Lichtstrahl 1, der von einer räumlich begrenzten Lichtquelle 2 ausgeht, wobei es sich bei der Lichtquelle 2 im Konkreten um zur Fluoreszenzemission angeregtes biologisches Probenmaterial handeln könnte. Der Lichtstrahl 1 trifft auf ein optisches Bauteil 3, das aus einem transparenten Material als Linse 4 in Form eines Halbzylinders ausgeführt ist. Der Lichtstrahl 1 durchläuft die zylinderförmige Linse 4 und wird beim Austritt aus der Linse 4 aufgrund von Brechung defokussiert, so dass sich ein divergenter Lichtstrahl 5 innerhalb einer Beleuchtungsebene ergibt, deren Flächennormale die Zylinderachse ist. Innerhalb der Beleuchtungsebene sind die Photonen statistisch verteilt.

Der aufgeweitete Lichtstrahl 5 trifft sodann auf eine Detektionseinrichtung, die mehrere, ein Array 6 bildende Detektoren 7 umfasst. In Fig. 1 sind beispielhaft lediglich fünf Detektoren 7 gezeigt, die zu einem eindimensionalen Array 6 zusammengefasst sind. Dadurch, dass die Photonen des Lichtstrahls 1 nicht in einem Detektor nachgewiesen werden, sondern sich gleichmäßig auf insgesamt fünf Detektoren 7 verteilen, erhöht sich die maximal mögliche Zählrate – und damit die maximale Beleuchtungsintensität – um den Faktor 5, entsprechend der Anzahl der Detektoren 7 des Arrays 6. Das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert sich entsprechend um den Faktor $\sqrt{5}$. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist somit – bei konstanter Integrationszeit pro Pixel – deutlich verbessert.

Fig. 2 zeigt eine Ausführungsform, bei der anstelle einer statistischen Photonenverteilung eine spektrale Photonenverteilung erzeugt wird. Die Aufspaltung in spektral unterschiedliche Kanäle in einer Dimension ist durch ein in dem Strahlengang des Lichtstrahls 1 angeordnetes Prisma 8 realisiert. Durch Drehung des Prismas 8 kann die spektrale Aufspaltung optimal an die jeweilige Konfiguration des Detektorarrays 6 angepasst werden.

Fig. 3 zeigt eine Ausführungsform, bei der der von der Lichtquelle 2 ausgehende Lichtstrahl 1 zunächst in einer Richtung (X-Richtung) entsprechend den obigen Ausführungen zu Fig. 1 mittels einer zylinderförmigen Linse 4 aufgespalten wird. Der aufgeweitete Lichtstrahl 5 trifft sodann auf ein Prisma 8, durch das der Strahl 5 in einer zur X-Richtung senkrechten Richtung (Y-Richtung) spektral aufgespalten wird. Hinter dem Prisma 8 befindet sich die Detektionseinrichtung, die aus einem zweidimensionalen Detektorarray 9 gebildet ist. Während die auf das Detektorarray 9 auftreffenden Photonen in X-Richtung gleichmäßig verteilt sind, ergibt sich in Y-Richtung eine spektrale Verteilung, wobei niederenergetische Photonen auf in Fig. 3 oben liegende Pixel 10 und höherenergetische Photonen auf weiter unten liegende Pixel 10 treffen.

Fig. 4 zeigt schließlich in einer schematischen Ansicht die Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung gemäß Fig. 1 mit einer statistischen Aufspaltung des Lichtstrahls 1 in einer Richtung und einem eindimensionalen Detektorarray 6. Zusätzlich ist die signalverarbeitende Elektronik dargestellt. Jedem Detektor 7 des Detektorarrays 6 ist über eine elektrische Verbindung 11 ein Photonen-zähler 12

zugeordnet, so dass die Photonenereignisse pixelweise ausgelesen und gezählt werden können. Die Ausgänge der Photonen-zähler 12 werden über elektrische Verbindungen 13 einem Addierer 14 zugeführt, in dem die nachgewiesenen Photonenereignisse des gesamten Detektorarrays 6 addiert werden. Die auf diese Weise erzeugte Zählrate wird als Ausgangssignal 15 bereitgestellt.

Abschließend sei ganz besonders hervorgehoben, dass die zuvor rein willkürlich gewählten Ausführungsbeispiele lediglich zur Erörterung der erfindungsgemäßen Lehre dienen, diese jedoch nicht auf diese Ausführungsbeispiele einschränken.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Nachweis von Photonen eines Lichtstrahls (1), der von einer räumlich begrenzten Quelle (2) ausgeht, insbesondere zum Einsatz in einem Fluoreszenzmikroskop, umfassend eine Detektionseinrichtung, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinrichtung mindestens zwei Detektoren (7) umfasst und dass im Strahlengang des Lichtstrahls (1) ein Bauteil (3) vorgesehen ist, mit dem der Lichtstrahl (1) derart aufspaltbar ist, dass sich die Photonen zum Zwecke des Nachweises auf die Detektoren (7) verteilen.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektoren (7) zum Einzelphotonennachweis (single photon counting) geeignet sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Detektoren (7) um Avalanche-Photodioden (APD), Photomultiplier und/oder EMCCDs (Electron Multiplying CCD) handelt.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektoren (7) ein ein-, zwei- oder dreidimensionales Array (6, 9) bilden.
5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das dreidimensionale Array aus hintereinander angeordneten, teillichtdurchlässigen EMCCDs gebildet ist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauteil (3) eine Aufspaltung des Lichtstrahls (1) mit einer statistischen Verteilung der Photonen, vorzugsweise durch Defokussieren, erzeugt.
7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauteil (3) eine zylinderförmige Linse (4) ist.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauteil (3) eine Aufspaltung des Lichtstrahls (1) mit einer spektralen Verteilung der Photonen erzeugt.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauteil (3) ein Prisma (8) ist.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauteil (3) ein elektrooptisches Element oder ein elektromechanischer Scanner ist.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Bauteile (3) im Strahlengang des Lichtstrahls (1) hintereinander angeordnet sind.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass ein elektronischer Zähler (12) zum Photon-Counting nahe am Detektor (7), insbesondere auf dem Chip eines EMCCD, angeordnet ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zähllogik zum Photon-Counting in einem FPGA (Field Programmable Gate Array) programmiert ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass vor und/oder nach dem Zähler (12) ein Addierer (14) vorgesehen ist.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die zugehörige Elektronik monolithisch aufgebaut ist.

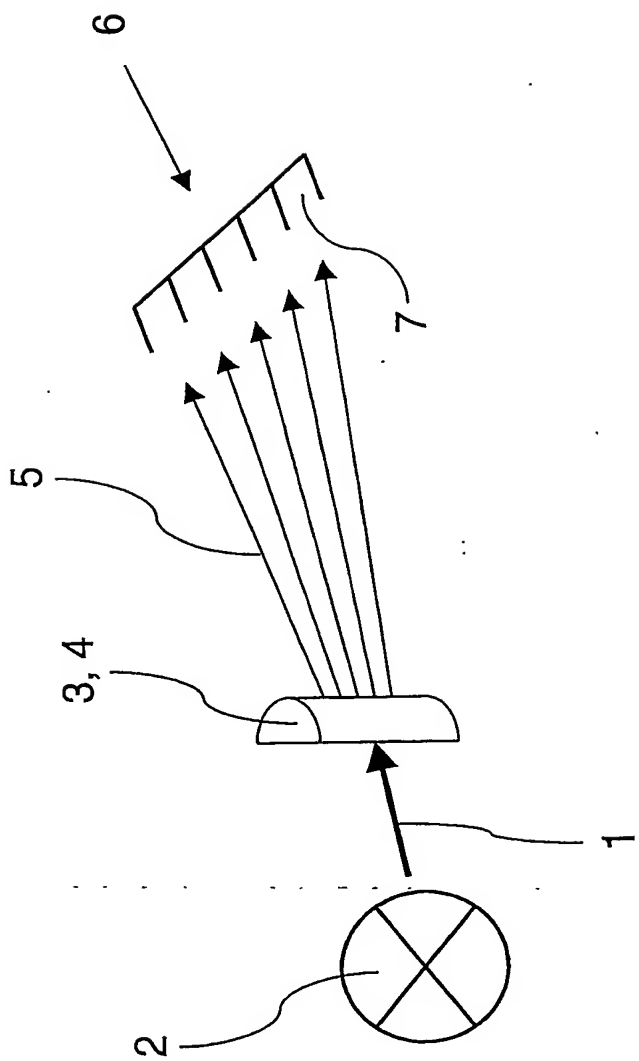


Fig.1

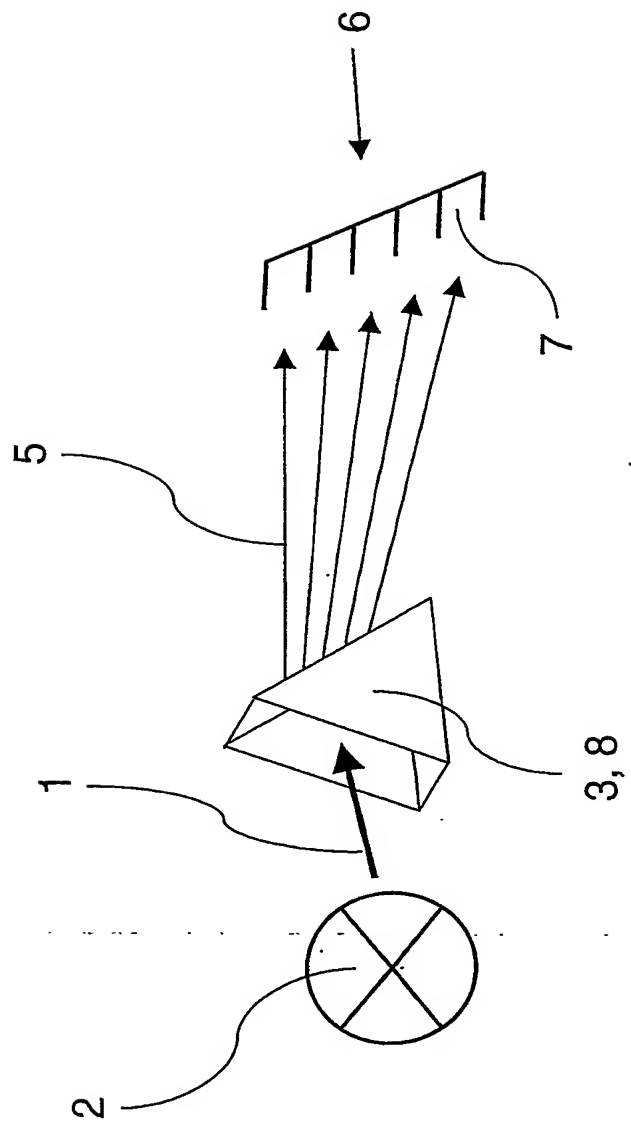


Fig.2

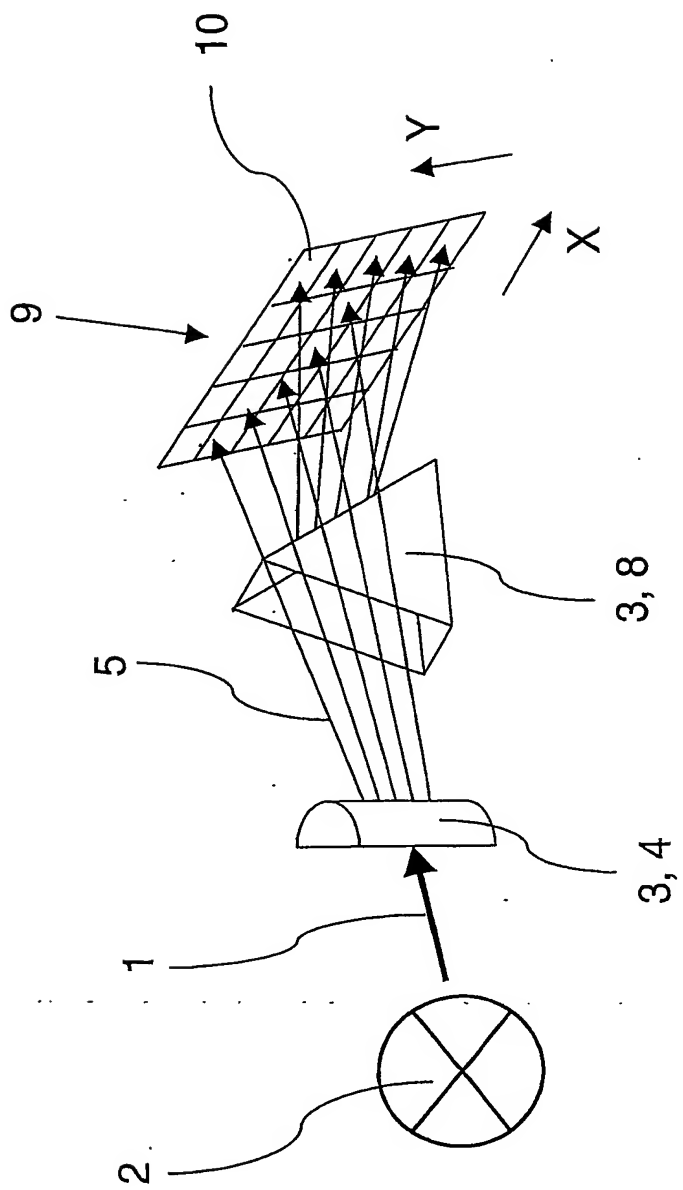


Fig.3

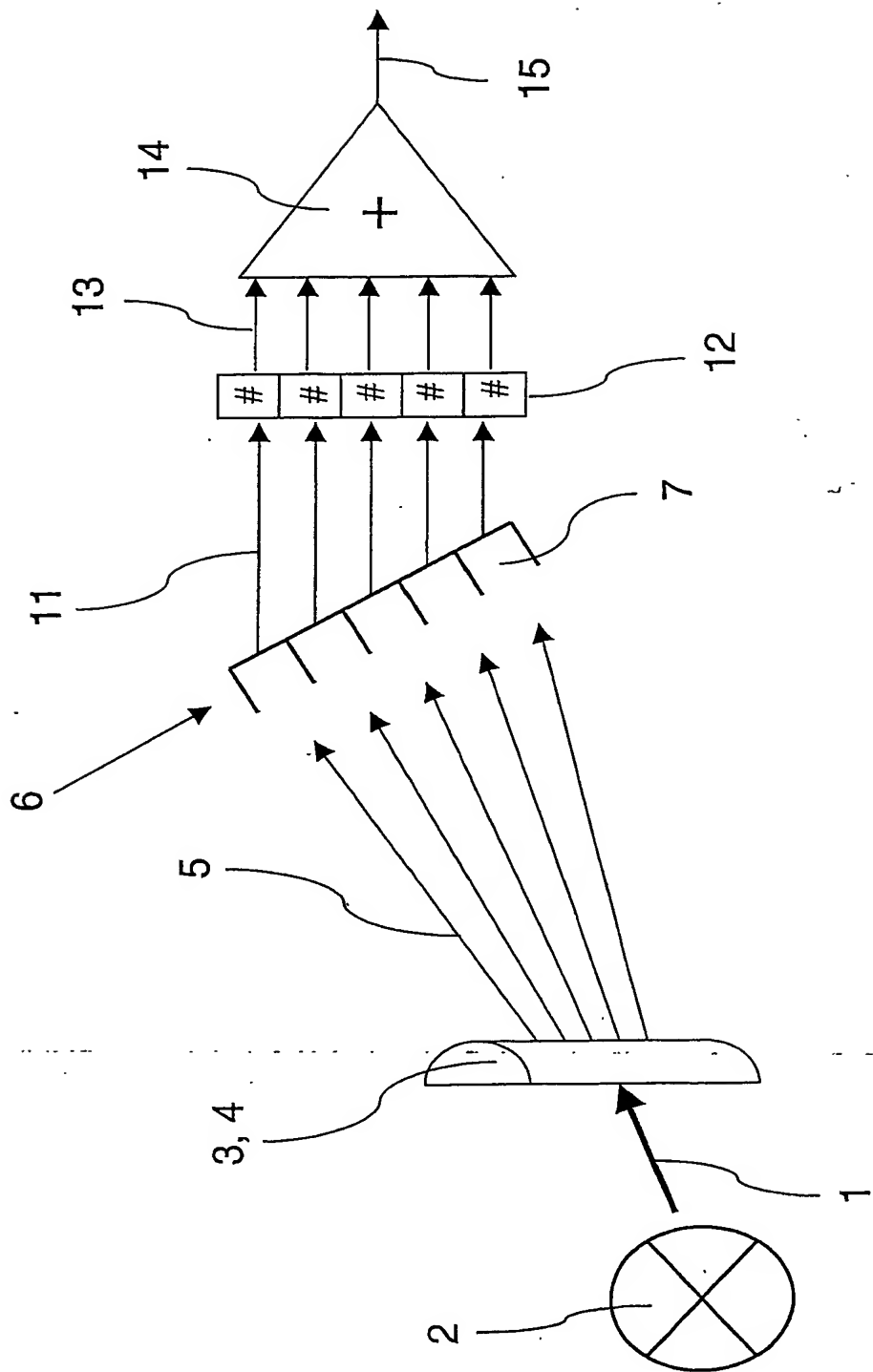


Fig.4

Z u s a m m e n f a s s u n g

Eine Vorrichtung zum Nachweis von Photonen eines Lichtstrahls (1), der von einer räumlich begrenzten Quelle (2) ausgeht, insbesondere zum Einsatz in einem Fluoreszenzmikroskop, umfassend eine Detektionseinrichtung, ist zur Erhöhung der maximalen Zählrate, die von der Detektionseinrichtung verarbeitet werden kann, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinrichtung mindestens zwei Detektoren (7) umfasst und dass im Strahlengang des Lichtstrahls (1) ein Bauteil (3) vorgesehen ist, mit dem der Lichtstrahl (1) derart aufspaltbar ist, dass sich die Photonen zum Zwecke des Nachweises auf die Detektoren (7) verteilen.

(Fig. 1)

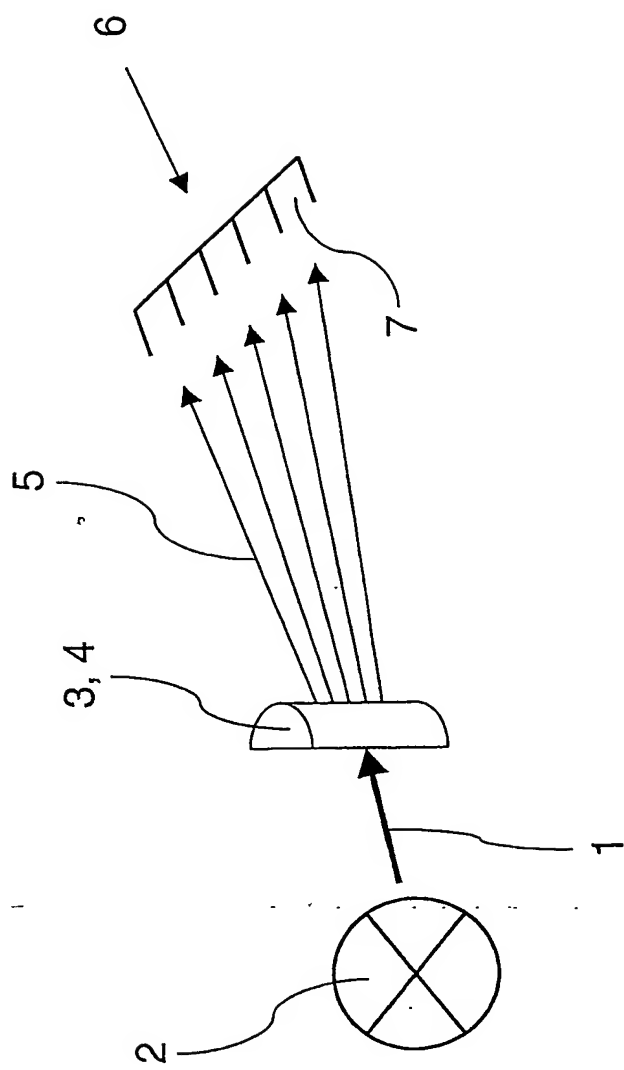


Fig.1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY:

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.